Aus dem Anatomischen Institut der Universität Basel
Vorsteher: Prof. Dr. med. et phil. G. Wolf-Heidegger

Anwendung ausgewählter histochemischer Reaktionen zum Studium der Binde- und Stützgewebsdifferenzierung am unentkalkten Knochenschnitt

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der gesamten Heilkunde
der medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

Konrad Hell

von Stein (SG)

1963

BASEL (Schweiz) S. KARGER NEW YORK

Von der medizinischen Fakultät Basel
genehmigt auf Antrag von
Professor Dr. med. R. Schenk

Tag der Promotion: 4. November 1963

Erschienen in «Acta Anatomica», vol. 51, Nr. 3, pp. 177–197 (1962)

Acta anat. *51*: 177–197 (1962)

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Basel
Vorsteher: Prof. Dr. med. et phil. G. Wolf-Heidegger

ANWENDUNG AUSGEWÄHLTER HISTOCHEMISCHER REAKTIONEN ZUM STUDIUM DER BINDE- UND STÜTZGEWEBSDIFFERENZIERUNG AM UNENTKALKTEN KNOCHENSCHNITT[1]

Von KONRAD HELL

I. Einleitung

Untersuchungen über die Differenzierung von Stützgeweben, und im speziellen das Studium der Knochenentwicklung, des Knochenwachstums und der Knochenregeneration, werden durch die bei der Herstellung von Schnittpräparaten notwendige Entkalkung bedeutend erschwert. Alle gebräuchlichen Entkalkungsverfahren beeinträchtigen die Darstellbarkeit zytologischer Einzelheiten und zerstören oft die empfindlichen, feinen geweblichen Zusammenhänge. Ganz besonders eingeschränkt wird auch der Anwendungsbereich histochemischer Reaktionen, werden doch durch die Zwischenwässerungen und durch die Säurebehandlung viele Stoffe verändert oder herausgelöst. Aus diesen Gründen erstrecken sich histochemische Arbeiten über Ossifikationsvorgänge, wie sie *Pritchard* [1952] und andere Autoren ausgeführt haben, nur auf embryonale Stadien, solange die Härte des wachsenden Knochens das Schneiden mit der üblichen Technik noch nicht verhindert.

Angesichts der Entwicklung neuer Einbettungsverfahren, welche das Schneiden harter Objekte ermöglichen, schien es uns aussichtsreich, die Verwendbarkeit einer solchen Methode in Kombination mit ausgewählten histochemischen Reaktionen am Beispiel des nicht entkalkten Knochens zu prüfen.

Wir benutzten dazu die von *Hirsch und Boellaard* [1958] angegebene Methylmethacrylat-Einbettung, welche Dünnschnitte von 5μ Dicke bei gleichzeitig sehr geringer Schrumpfung und einwandfreier Zytologie erlaubt, zusammen mit 1. der Methylgrün-Pyronin-Färbung zur Darstellung der Ribonukleinsäure (RNS) und der Desoxyribonukleinsäure (DNS) – und 2. der PAS-Reaktion zum Nachweis von Mucopolysacchariden. So zerfiel die uns gestellte Aufgabe in zwei Teile, nämlich einerseits die Eignungsprüfung der Methylmethacrylat-Einbettung für die in Aussicht genommenen histochemischen Reaktionen, sowie anderseits das Studium der Diffe-

[1] Die Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von Prof. Dr. *R. Schenk* durchgeführt.

renzierung von Binde- und Stützgewebe, vor allem der Osteogenese, am unentkalkten Schnittpräparat.

II. Material und Methode

a) Material: Als Untersuchungsmaterial gelangen Rumpf-, Extremitäten- und Schädelknochen junger Mäuse und Ratten zur Verarbeitung. Infolge des raschen Wachstums dieser Tiere und der damit einhergehenden hohen Stoffwechselintensität kommen an diesen Objekten Unterschiede im Verteilungsmuster bestimmter Stoffgruppen besonders klar zum Ausdruck. Außerdem dürfen die Präparate im Hinblick auf die Leistungsgrenze des uns zur Verfügung stehenden Mikrotoms eine gewisse zulässige Größe nicht überschreiten. Vergleichsweise ziehen wir auch Skelettstücke menschlicher Embryonen und Föten verschiedener Altersgruppen heran.

b) Fixation: Nach der Entnahme aus dem frisch getöteten Tier werden die Objekte in *Carnoy* fixiert (1–2 Std.), das sich im Hinblick auf die Methylgrün-Pyroninfärbung bei früheren Untersuchungen am besten bewährt hat (*Rickenbacher* [1952], *Hermann* [1956], *Schenk* [1957]). Es scheint uns auch in Kombination mit der Methylmethacrylat-Einbettung den von *Brachet* [1959] ebenfalls empfohlenen Fixierungsflüssigkeiten, wie Alkohol, Alkohol-Eisessig, oder gar Alkohol-Formol-Eisessig, überlegen.

c) Entwässern: Im Anschluß an die Fixation wird das Material zur Entwässerung direkt in absoluten Alkohol gebracht. Längeres Verweilen (einige Tage) beeinflußt die Schneid- und Färbbarkeit nicht nachteilig.

d) Einbetten: Die Einbettung erfolgt nach dem von *Boellaard und Hirsch* [1958] angegebenen, von *Burkhardt*[1] modifizierten Verfahren. Als Medium wird Methylmethacrylat verwendet, dem als Weichmacher Polyäthylenglykol und Dibutylphthalat, sowie als Polymerisationsbeschleuniger Benzoylperoxyd beigegeben sind. Für die ausführliche Besprechung der Methode sei auf die genannten Arbeiten verwiesen, ergänzend aber noch einige technische Einzelheiten beschrieben:

Für unser Material hat sich folgende Zusammensetzung des Mediums als vorteilhaft gezeigt:

Methylmethacrylat	100.0 ml
Polyäthylenglykol 1500	20.0 g
Dibutylphthalat	14.0 ml
Benzoylperoxyd	2.0 g

Im Gegensatz zu *Boellaard und Hirsch* entfernen wir das dem Methylmethacrylat als Stabilisator beigegebene Hydrochinon durch Ausschütteln mit wäßriger gesättigter Sodalösung, da wir den Eindruck haben, daß Hydrochinon die Färbbarkeit ungünstig beeinflußt.

Als Polymerisationsgefäße dienen uns Tablettenröhrchen verschiedenen Durchmessers. Die Präparatstücke werden in einer für die gewünschte Schnittrichtung geeigneten Orientierung mit Nadeln, welche den Korkstopfen durchbohren, angespießt, in die Einbettungsflüssigkeit getaucht und 12 Stunden bei 30° C gut verschlossen aufbewahrt. Dann erneuert man das Einbettungsmittel und läßt dieses bei 45° C polimerisieren, was innert 12–24 Std. geschieht. Zur Verhinderung der sich da-

[1] Herrn Dr. med. *R. Burkhardt* (1. medizinische Universitätsklinik München), der uns in die Methode eingearbeitet hat, sei an dieser Stelle herzlich gedankt.

bei bildenden Blasen haben wir verschiedene Verfahren versucht: einmal das von *Boellaard* empfohlene Einstellen in ein Wasserbad, dann eine wiederholte Vibrationsbehandlung mit dem Ultraschallgerät, ferner die Entlüftung der Präparate im Vakuum. Trotz all dieser Maßnahmen hat sich die Blasenbildung nicht vollständig unterbinden lassen. Wir sind deshalb dazu übergegangen, die Röhrchen einfach in den Thermostaten zu verbringen und die bei den Schnitten kaum störenden Gasblasen in Kauf zu nehmen.

e) Schneiden: In das Jung-Mikrotom 1120 mit elektrischem Antrieb setzen wir im Winkel von 12° ein Messer mit Schliff D Sonderhärte ein. Im langsamen Durchzug übernehmen wir mit der Pinzette die mit 30 %igem Alkohol angefeuchteten Schnitte und legen sie auf die Oberfläche von destilliertem Wasser.

f) Aufkleben: Auf einem gemäß *Apathy* vorbehandelten Objektträger (nach Entfettung Aufbringen einer dünnen Eiweiß-Glycerin-Schicht und Trocknen über der Flamme) wird ein Schnitt mit 96 %igem Alkohol erweicht, mit Präpariernadeln ausgebreitet und mit Hilfe eines weichen Marderhaar-Pinsels sorgfältigst glattgestrichen, ansonst später die Gefahr des Abschwimmens besteht. Anschließend wird dieser noch feucht durch faserfreies Filtrierpapier (Zigarettenpapier zum Beispiel sehr geeignet) bedeckt, auf andere Objektträger gelegt, gepreßt und im Thermostat bei 30°–40° C getrocknet. Sodann lassen sich die Papierchen mühelos abziehen.

g) Entfernen des Einbettungsmittels: Durch Einstellen der Schnitte in Methylglykolacetat während 3×10 Min. wird das Methylmethacrylat entfernt, wobei die letzte Portion 1 %–2 % Celloidin zugesetzt erhält. Anschließend bringt man sie direkt in 70 %igen Alkohol und von dort absteigend in Aqua dest.

h) Färben: Es sind folgende Färbemethoden ausgeführt worden:

1. Methylgrün-Pyronin-Färbung. Diese gibt einen Hinweis auf den Gehalt an RNS, welche – wie *Brachet* [1959] gezeigt hat – an der Proteinsynthese wesentlich beteiligt ist. DNS enthaltende Zellstrukturen werden durch Methylgrün blaugrün, RNS-haltige durch Pyronin rot gefärbt.

Wir wenden die von *Schenk* angegebene Vorschrift an: Wesentlich ist schon die Wahl der Farbstoffe. Uns hat sich das Pyronin GS der Firma Chroma AG (Stuttgart), das sich bei der Entwässerung durch Alkohol nur wenig herauslöst und eine sehr gute Spezifität auf RNS aufweist, ausgezeichnet bewährt. Das Methylgrün (Geigy) wird durch Ausschütteln mit Chloroform vom Methylviolett gereinigt und sogleich bei 50°–60° C eingedampft, wodurch man grüngelbe Kristalle erhält.

Die Lösung wird bereitet, indem man zu 100 ml Michaelis-Puffer (pH 4,9) 150 mg Methylgrün und 200 mg Pyronin GS gibt (die Farblösung ist monatelang haltbar, auch wenn sie bei Zimmertemperatur aufbewahrt wird).

Nach 1–2 Stunden Färbedauer wird in Aqua dest. gespült, in 96 %igem Alkohol ca. 30 Sek. differenziert und in Methylglykolacetat während einer Minute das Celloidin beseitigt. Ein neutrales Einschlußmittel, wie zum Beispiel Caedax oder HSR mounting medium for microscopy, gewährleistet eine gute Haltbarkeit der Dauerpräparate. Durch Pressen mit Wäscheklammern verstreichen noch die letzten feinen Falten.

Die Spezifität der Pyroninfärbung wird in üblicher Weise (1 Stunde bei 60° C in $^1/_{10}$ promilliger wäßriger Ribonuklease-Lösung) geprüft.

2. PAS (Perjodic-Acid-Schiff)-Reaktion. Diese von *Hotchkiss* eingeführte Reaktion besteht darin, daß durch Perjodsäure-Behandlung benachbarte Hydroxylgruppen im Kohlehydrat-Molekül zu Aldehyden oxydiert werden, die dann zusam-

men mit dem an sich farblosen Leucofuchsin einen polysubstituierten Farbstoff bilden. Die Färbeintensität ist abhängig von der Zahl der reagierenden Aldehydgruppen der unlöslichen Polysaccharide sowie ihrem Polymerisationsgrad. Hochmolekulare Mucopolysaccharide färben sich dabei rosa an; bei Depolymerisation verstärkt sich die Leuchtkraft zu Purpurrot. Diese Reaktion gibt uns also die Möglichkeit, Polysaccharide, Mucopolysaccharide und Mucoproteide darzustellen, wobei bis heute allerdings die Spezifität umstritten bleibt (vgl. *Lison* [1953] und *McLean* [1955]).

3. *Weitere Färbungen:* Zur Übersicht bewährt sich die *Goldner-Färbung*, welche die kollagenen Fasern sehr schön hervorhebt und deshalb von uns routinemäßig als Vergleichsfärbung zugezogen wird. Die *Azan-Färbung* hat wegen mangelhafter Anfärbung durch das Azocarmin schlechte Resultate geliefert; auch lösen sich bei der erforderlichen Erwärmung auf 60° C die Präparate oft vom Objektträger.

Auf die *Phosphatase-Reaktion* haben wir verzichtet, da auf Grund von zahlreichen Untersuchungen hinlänglich bekannt ist, daß damit nur ein Indiz für die Intensität des Energiestoffwechsels erfaßt wird.

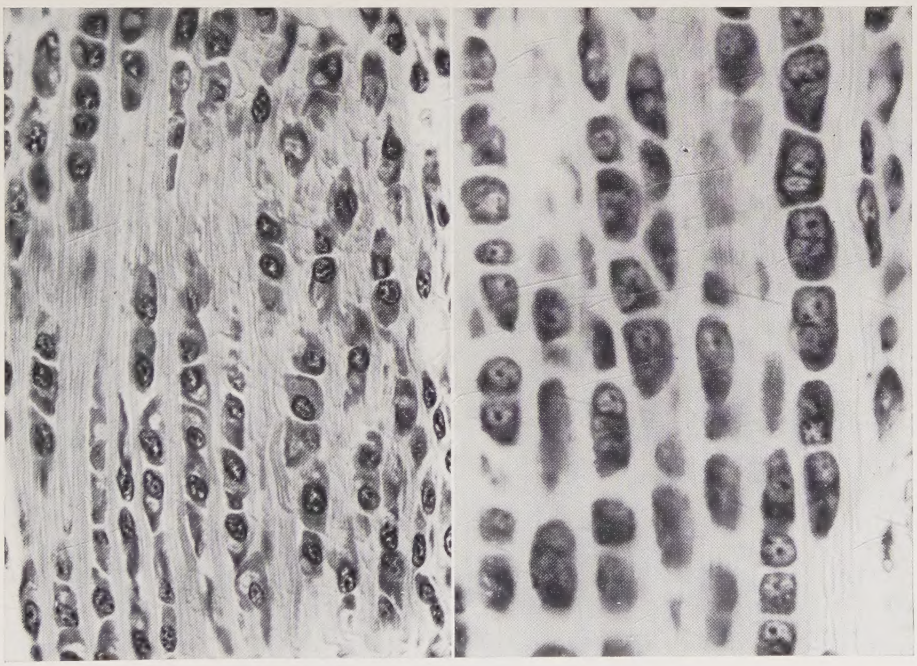
III. Befunde

1. Mesenchym und Bindegewebe

Zum Studium der *undifferenzierten Mesenchymzelle* haben wir auf embryonales menschliches Material zurückgegriffen, da ein Mesenchym im strengen Sinne postnatal nicht mehr vorgefunden wird. Die Mesenchymzelle paßt sich in der Form den örtlichen Gegebenheiten des Zellverbandes an. Vital stellt sie sich breitflächig ausgedehnt dar (*Debrunner* [1950]); bei der Fixation und beim Entwässern wird sie spindel- oder sternförmig mit schlanken, fast fadenartigen Zytoplasma-Ausläufern. Die Kerne sind meist stab- bis dreieckförmig. Sehr oft enthalten sie einen exzentrischen, kleinen pyroninaffinen Nucleolus. Das Chromatingerüst ist fein strukturiert und die Kernmembran dünn, aber deutlich. Mitosen werden häufig gefunden. Die Interzellularsubstanz ist flüssig; manchmal zeigen sich bei fixierten Präparaten Gerinnsel. Die PAS-Reaktion färbt im Zytoplasma kleinste, weinrote Tropfen.

Im Unterschied zur Mesenchymzelle lassen sich bei *Fibroblasten* und *Fibrozyten* in der Interzellularsubstanz fibrilläre Strukturen nachweisen. Die Veränderungen im Zytoplasma sind dagegen kaum signifikant; immerhin scheint eine leichte Vermehrung der pyroninaffinen Substanz in Erscheinung zu treten. Der Zellkern ist etwas gröber granuliert und enthält oft zwei Nucleoli. Die PAS-Reaktion fällt sowohl inter- wie intrazellulär negativ aus, doch sind Dünnschnitte zur sichern Beurteilung wenig geeignet, da das Protoplasma nur in geringer Ausdehnung getroffen wird.

Wesentlich günstiger stellen sich die faserbildenden *Zellen in Sehnen und Ligamenten* dar (Abb. 1), da sie dort in Reihen zusammengedrängt sind und so in ihrer Form einheitlicher erscheinen. Entsprechend der intensiven Proteinsynthese sind die zytologischen Befunde eindrücklich. Der eher runde, fein granulierte Kern ist randständig und dem Kern der benachbarten Zelle zugewandt. Er enthält ein oder zwei große, im Methylgrün-Pyronin-gefärbten Präparat rot aufleuchtende Nucleoli. Das stark basophile Zytoplasma zeigt eine knapp kerngroße Aufhellungszone, die knäuelförmig aufgewundene tubuläre Elemente erkennen läßt, zwischen denen immer wieder pyroninaffine Zytoplasmaanteile aufgefunden werden. Wir betrachten diese Aufhellungszone in Übereinstimmung mit *Pritchard* als den ungefärbten Golgi-Komplex und sprechen in der Folge vom Golgi-Negativ. Die PAS-Reaktion deckt wiederum weder intra- noch interzellulär spezifisch gefärbte Strukturen auf. Die Goldner-Färbung



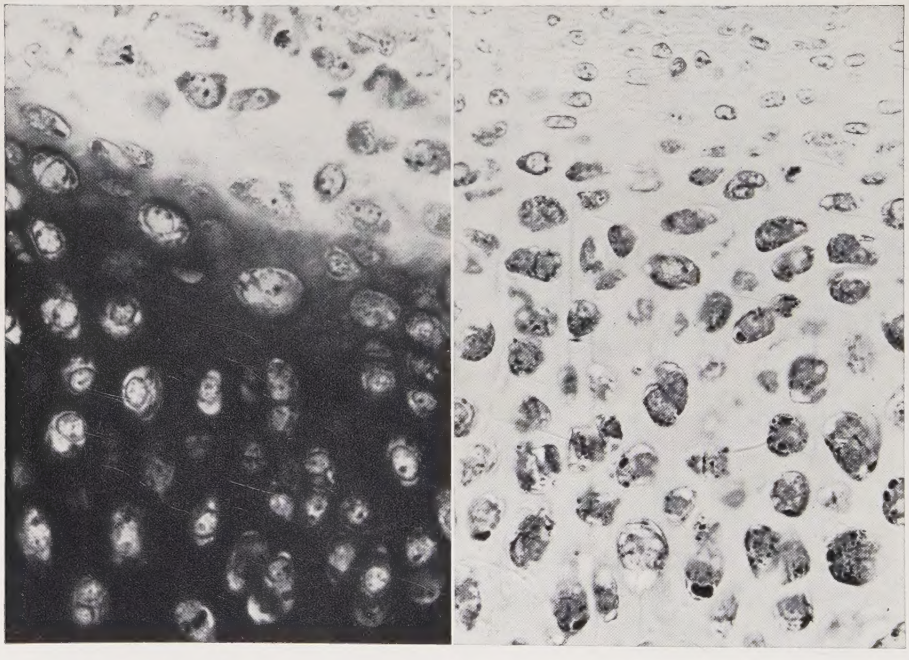
a b

Abb. 1. Längsschnitt durch das Kreuzband einer 1 Wochen alter Maus. *a*) Die Goldner-Färbung (500 : 1) macht deutlich, daß sowohl die Bindegewebszellen als auch die kollagenen Fasern regelmäßig in Längsrichtung angeordnet sind. *b*) Der Ribonukleinsäure-Nachweis mit Methylgrün-Pyronin wird im Cytoplasma und den Nucleoli stark positiv. Das Golgi-Negativ erscheint als Aufhellungszone (800 : 1).

macht deutlich, daß kollagene Fasern in der Grundsubstanz zwischen den Zellen derselben Reihe fehlen.

2. Knorpeldifferenzierung

Die *Chondroblasten* unterscheiden sich zu Beginn der Knorpeldifferenzierung kaum von den Fibroblasten und Fibrozyten des Perichondriums. Durch das Austreten aus dem weitmaschigen Verband runden sich ihre Zellen ab (Abb. 2). Der Kern ist nun größer, enthält Chromatinbrocken und einen Nucleolus. Die Basophilie ist in den peripheren Zytoplasma-Anteilen am ausgesprochensten, was als Hinweis auf die dort für die Fibrillen der Knorpelsubstanz einsetzende Kollagensynthese gewertet werden darf, die Golgi-Zone wenig ausgedehnt, aber klar als Aufhellung erkennbar. Die anfangs blasse Interzellularsubstanz zeigt sehr bald eine durch vermehrte Einlagerung von Mucopolysacchariden verursachte stark metachromatische



a b

Abb. 2 Knorpelbildung im Fibula-Köpfchen, Querschnitt, 2 ½ Wochen alte Maus, 500 : 1. *a*) Die Methylgrün-Pyronin-Färbung zeigt den plötzlichen Beginn und die starke Zunahme der Metachromasie. Am untern Bildrand in der Mitte eine Zelle in Mitose. *b*) PAS-Reaktion. Die Grundsubstanz färbt sich nur wenig; im Zytoplasma konfluieren PAS-positive Tröpfchen.

Anfärbung mit Pyronin, die ihr Maximum eindeutig in den Knorpelteilen, welche der Zelloberfläche anliegen, erreicht. Die PAS-Reaktion ist dagegen in den Chondroblasten selber stärker positiv als in ihrer Umgebung.

Die *Chondrozyten des hyalinen Knorpels* werden durch Wasseraufnahme blasser und größer; es bilden sich Vakuolen und bei der Fixation schrumpfen die Zellen etwas, so daß sie sich von der Knorpelkapsel lösen. Die Kerne sind dicht strukturiert und enthalten in der Regel zwei Nucleoli. Das Golgi-Negativ ist immer noch deutlich. Mitosen sind auffallend häufig zu beobachten. Die Pyronin-Affinität nimmt in den Zellen während der Chondroblasten-Differenzierung ständig zu, in den reifen Knorpelstadien aber ab. Die durch Ribonuklease unbeeinflußbare Metachromasie der Grundsubstanz steigt im Laufe der Reifung rapid an. Nicht weniger charakteristisch fällt die PAS-Reaktion aus. Im Zytoplasma der Chondroblasten zeichnen sich leuchtend purpur-violette Tröpfchen ab, die konfluieren und auch

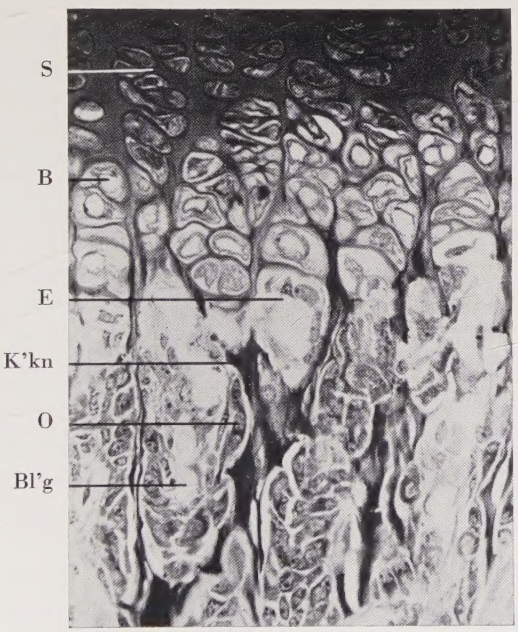


Abb. 3. Chondrale Ossifikationszone; Tibia sagittal, 1 ½ Wochen alte Maus, Methylgrün-Pyronin, 320:1. Übergang von Säulenknorpel (S) in Blasenknorpel (B) und Eröffnungszone (E) mit Kalkknorpelwaben (K'kn), in die von Osteoblasten (O) umgebene Blutgefäße (Bl'g) einwachsen.

noch bei ältern Chondrozyten vorhanden sind. Die Interzellularsubstanz ist ebenfalls leicht violett getönt, wobei jedoch die Farbintensität viel weniger zunimmt als die Metachromasie.

Beim *Faserknorpel*, welchen wir in den Menisci des Kniegelenkes und in den Zwischenwirbelscheiben untersucht haben, beschränkt sich die Knorpelbildung auf einzelne Inseln, die durch unmaskierte Faserbündel voneinander getrennt werden. Die Farbreaktionen der einzelnen Chondrone sind im übrigen identisch mit denjenigen des hyalinen Knorpels.

Ausgehend von diesen zytologischen Befunden sollen schon an dieser Stelle die sich *während der chondralen Ossifikation abspielenden Knorpelveränderungen* beschrieben werden (Abb. 3 und 4). In der *Proliferationszone* teilen sich die Chondrozyten gehäuft und ordnen sich zu Gruppen. Im *Säulenknorpel* liegen diese abgeplattet in Reihen, getrennt durch Balken aus intensiv und einheitlich metachromatisch gefärbter Knorpelsubstanz. Die PAS-Reaktion stellt die dicht mit konfluierenden Granula beladene Zelle dar und erreicht damit

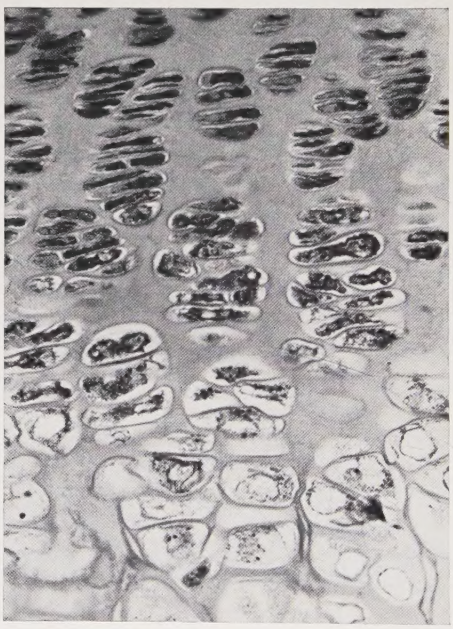


Abb. 4. Tibia sagittal, 2 ½ Wochen alte Maus, 400:1. Das Verhalten der Proliferationszone (P), des Säulenknorpels (S) und des Blasenknorpels (B) in der PAS-Reaktion.

intrazellulär ihr Maximum. Im *Blasenknorpel* nimmt das Zytoplasma weiterhin unter Vakuolenbildung an Volumen zu und gleichzeitig macht sich ein allgemeiner Verlust an Färbbarkeit sämtlicher Zellbestandteile bemerkbar, von dem auch die PAS-positiven und pyroninaffinen Substanzen betroffen werden, wobei sich die letzteren nun vor allem auf die randbildenden Partien konzentrieren. Die Form der Zelle wird bizarr, der Kern entrundet und strukturlos; schließlich ist nur noch seine Membran erkennbar. Die Metachromasie der Grundsubstanz überschreitet ihren Höhepunkt und variiert unregelmäßig sowohl im Farbton wie auch in der Intensität. In der *Eröffnungszone* verliert sich die Kontur der Kernmembran, Vereinzelt finden sich PAS-positive Körnchen in untergehenden Zellen.

Im Kalkknorpel zeigt die Metachromasie häufig granuläre, nahe beieinanderliegende Einlagerungen, welche einen bräunlichroten Farbton aufweisen.

3. Ossifikation

Anhand der Abb. 5–8 soll zuerst die *periostale Ossifikation* betrachtet werden. Die das Stratum fibrosum des Periosts bildenden Fibrozyten und Fibroblasten gehen über in die Prä-Osteoblasten und Osteoblasten der Kambiumschicht. Durch gegenseitige Anpassung ordnen sich die an sich ovoid geformten *Osteoblasten* zu einem fast epithelialen Verband und werden so entsprechend vielgestaltig. Ihr stark basophiles, fein strukturiertes Zytoplasma besitzt eine rundliche, über kerngroße Aufhellungszone, die dem Golgi-Apparat entsprechen dürfte und in deren Zentrum sich noch gewundene pyroninaffine Bänder finden. Aus dem exzentrisch gelegenen, großen Kern, der verhältnismäßig wenig DNS enthält und dessen Chromatin sich netzartig ausbreitet, stechen die durch den Gehalt an RNS im Methylgrün-Pyronin-Präparat leuchtend rot gefärbten Nucleoli heraus. Auch reife, dem Knochen anliegende Osteoblasten können sich noch mitotisch teilen. In der Grundsubstanz fehlt die Metachromasie, und die PAS-Reaktion fällt schwach violett aus, ist aber intrazellulär negativ.

Bei den als *Prä-Osteoblasten* bezeichneten Vorstufen handelt es sich um eher kleine Zellen mit weniger stark basophilem Zytoplasma, die Übergänge zu den Fibroblasten aufweisen.

Abb. 5 veranschaulicht die im allgemeinen geringe, gegen den Knochen zu noch ständig abnehmende Faserdichte des Periosts. Nur feinste kollagene Fibrillen ziehen zwischen den Osteoblasten hin-

durch und verlieren dann ihre Färbbarkeit. Lediglich an Stellen, wo Sehnen und Bänder einstrahlen, wird die Knochenhaut durch Faserbündel in der Substantia ossea fest verankert.

Auffallend ist, daß zahlreiche *Blutgefäße*, welche immer *von einer Scheide aus Osteoblasten umgeben* sind, die periostale Knochenmanschette durchbrechen (Abb. 9). Die vom Bild einer ausgewachsenen Diaphyse übernommene Vorstellung einer glatten, von Periost be-

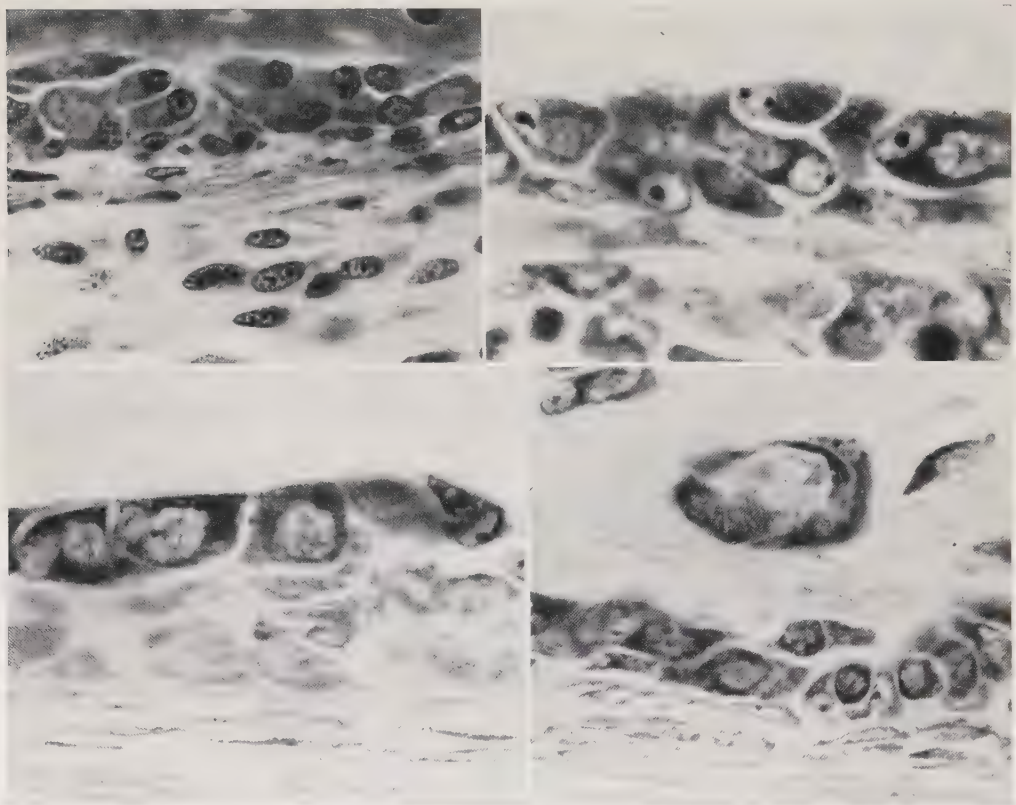


Abb. 5–8. Periostale Ossifikation. – *Abb. 5.* Faserdarstellung durch Goldner-Färbung; Periost der Lendenwirbelsäule bei 1 Wochen alter Maus, 800:1. – *Abb. 6.* Methylgrün-Pyronin-gefärbte Osteoblasten, Tibia-Periost, Maus von 1 ½ Wochen, 1250:1. Man beachte die großen Nucleoli sowie das Golgi-Negativ mit den noch pyroninaffinen Zytoplasma-Strukturen. – *Abb. 7.* Schichtung des Periosts: von unten nach oben folgen sich Fibrocyten, Fibroblasten, Prä-Osteoblasten, Osteoblasten und Substantia ossea. Die Osteoblasten stechen durch ihren hohen Gehalt an RNS heraus (gleiches Präparat wie in Abb. 6 und 8; Vergrößerung 1250:1). – *Abb. 8.* Ein Osteoblast löst sich aus dem Zellverband und wandelt sich zum Osteozyten um. In Bildmitte ein mit Osteoblasten tapezierter Gefäßkanal (400:1).

deckten Corticalis-Oberfläche trifft auf diesen Entwicklungsstufen in keiner Art und Weise zu (vgl. *Pinard*).

Indem sich die Osteoblasten aus dem Zellverband lösen und von Knochensubstanz eingemauert werden, wandeln sie sich in eiförmige *Osteozyten* um (Abb. 8). Dabei verkleinert sich die Zelle; das Zytoplasma verliert mit der Zeit die Basophilie, und das Golgi-Negativ verschwindet. Das Chromatingerüst des Kerns vergröbert und verdichtet sich und verdeckt häufig den unscheinbaren Nucleolus. Die Dünnschnitte und die bisher besprochenen Färbemethoden gestatten nicht, die Zytoplasma-Ausläufer der Osteozyten hervorzuheben. Deshalb sind zur Ergänzung Knochenschliffe herangezogen worden, hergestellt nach den Angaben von *Ruppricht* [1930] und *Krompecher* [1937]. Nach Stückfärbung mit basischem Fuchsin gelingt es so mit eindrücklicher Klarheit, die feinen Fortsätze sichtbar zu machen, durch welche die Osteozyten miteinander in Verbindung stehen (Abb. 10). – Es kann hier erwähnt werden, daß nach Stückfärbung mit Fuchsin auch die Methylmethacrylat-Einbettung und damit die Herstellung von Schnittpräparaten möglich ist. Doch bringt der Dünnschnitt infolge des Verlustes des räumlichen Gefüges die Cytoplasma-Ausläufer nur bruchstückweise zur Darstellung. – Die Fuchsinfärbung an den Gefäßen und den sie begleitenden Zellen fällt hingegen viel zu intensiv aus, um Einzelheiten erkennen zu lassen. Die

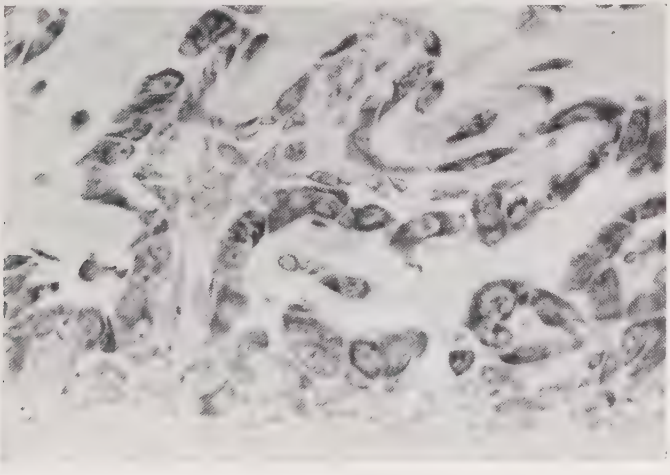


Abb. 9. Tibia Diaphyse, periostaler Teil, 1 Woche alte Maus, Methylgrün Pyronin, 500:1. Die Osteoblasten des Periosts umhüllen ein in den Knochen führendes Gefäßbäumchen.

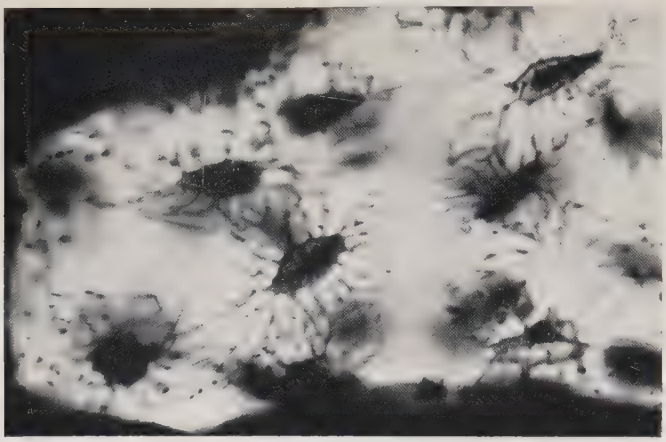


Abb. 10. Schädeldach der 3 Wochen alten Ratte; 800:1. Der Knochenschliff nach Stückfärbung mit basischem Fuchsin gibt Einblick in die räumliche Anordnung der Osteocyten mit ihren zahlreichen, feinen, sich aufteilenden Ausläufern.

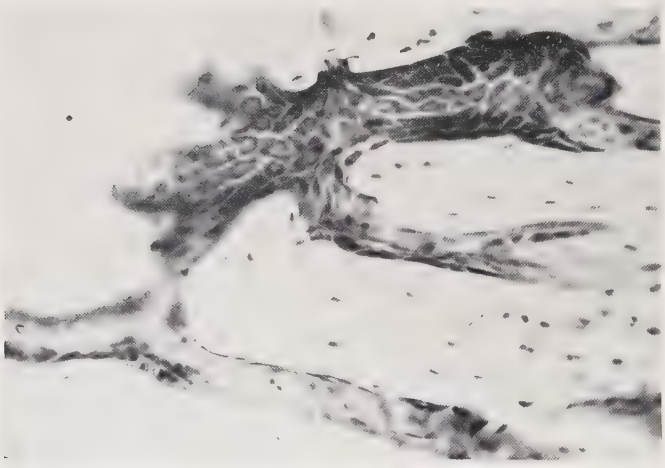


Abb. 11. Schädeldach der 5 Wochen alten Ratte; 250:1. Auch im Schliffpräparat stellt die Methylgrün-Pyronin-Färbung die Osteoblasten fast selektiv dar, da der RNS-Gehalt von andern Zellen dem ihrigen nicht gleichkommt. Infolge der beträchtlichen Dicke (ca. 60μ) erkennt man, wie das Gefäß mit einem Strumpf von Osteoblasten überzogen ist.

Anwendung der Methylgrün-Pyronin-Färbung auf solche Schliffe bestätigt, daß die Osteoblasten die sich aufteilenden Blutgefäße des wachsenden Knochens pflastersteinartig und lückenlos umgeben (Abb. 11).

Die *Substantia ossea* weist keine Metachromasie auf, stellt sich aber mit der PAS-Reaktion blaß-violett dar, wobei bei nachträglicher Entkalkung eine Zunahme dieser diffusen Anfärbung in Erscheinung tritt. Im Gegensatz zu *Ponlot* [1960], der Untersuchungen am Knochen des erwachsenen Hundes vorgenommen hat, können wir keinen stärker PAS-positiven Osteoidsaum bemerken.

Bei allen Formen von Ossifikationsvorgängen sind diese beschriebenen zytologischen Details zutreffend; ebenso bleiben die Nachbarschaftsbeziehungen von Blutgefäßen zu Osteoblasten im Vordergrund. Unterschiedlich ist nur das Gerüstwerk, welches die Verknöcherungszonen gegen Druck und Zug abschirmt.

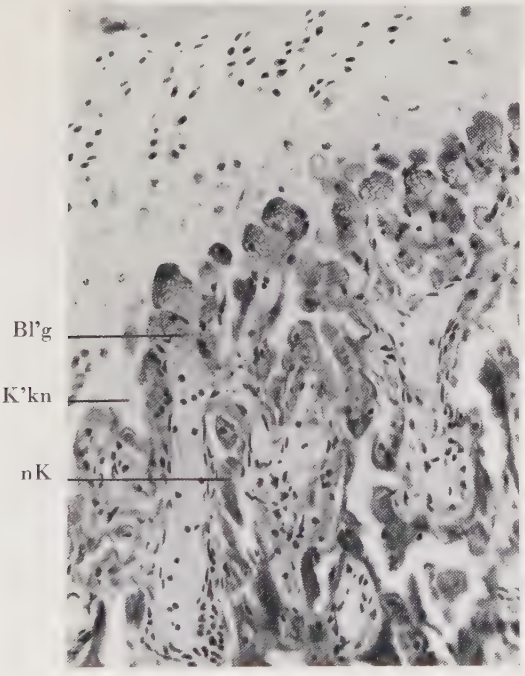


Abb. 12. Längsschnitt durch die chondrale Ossifikationszone der Tibia, 4 Wochen alte Maus, 320:1. Diese Goldner-Färbung führt vor Augen, wie die prall gefüllten Blutgefäß-Schlingen (Bl'g) jeden in der Eröffnungszone entstehenden Hohlraum ausfüllen. Der von den begleitenden Osteoblasten neugebildete Knochen (nK) hebt sich dunkel (grün) von den farblosen Kalkknorpelresten (K'kn) ab.

Im Falle der *chondralen Ossifikation* (Abb. 3 und 12–14) übernimmt der Knorpel die Rolle dieses intermediären Stützgewebes. Die dabei in ihm ablaufenden Veränderungen sind bereits früher zur Sprache gekommen (siehe S. 184). Der Vorteil der unentkalkten Dünnschnitte und der angewandten Farbreaktionen liegt vor allem in der geringen Schrumpfung, die den direkten Kontakt zwischen Zellen und Knochenbälkchen nicht verändert. So bleibt die räumliche Anordnung und damit auch die Bedeutung der Blutgefäße sichtbar, welche, von Osteoblasten überzogen, zwischen den Kalkknorpelresten in die Verknöcherungszone eindringen. Sie bilden ein dichtes, dreidimensionales Netzwerk von Schlingen, das alle in der Eröffnungszone entstehenden Hohlräume vollständig ausfüllt (Abb. 12 und 13). Den wabenartig angeordneten Kalkknorpelsepten legen sich die Osteoblasten an und lagern ihnen neugebildete Knochensubstanz auf, welche sich später in definitive Substantia ossea umwandelt, soweit sie nicht von Osteoklasten wieder abgebaut wird. Für die Schichtenfolge sei auf Abb. 14 verwiesen.

IV. Synthese und Diskussion

Von den in der Einleitung gemachten Überlegungen ausgehend, haben wir das Verhalten der Ribonukleinsäure während der Diffe-

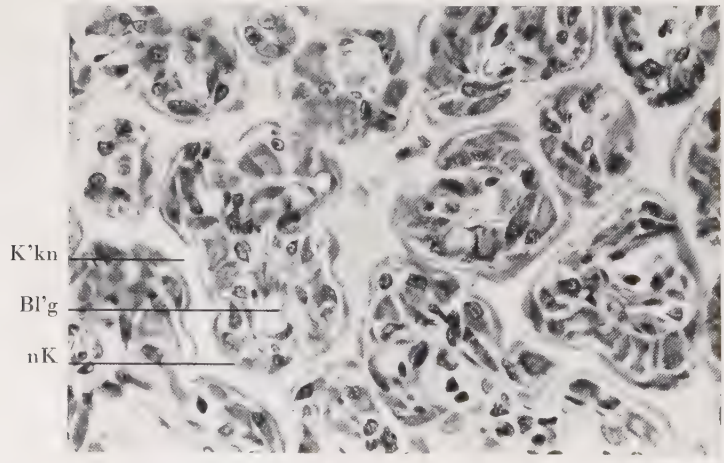


Abb. 13. Querschnitt durch chondrale Ossifikationszone der Tibia, 2 ½ Wochen alte Maus, Goldner-Färbung, 400:1. Der Reichtum an einsprossenden Gefäß-Schlingen, welche alle von Osteoblasten umgeben sind, die mit der Knochenbildung begonnen haben, ist eindrücklich (Legende wie in Abb. 12).

renzierung der Binde- und Stützgewebe untersucht. Die Befunde schließen an die Ergebnisse an, die *Pritchard* [1952] über die Knorpel- und Knochenentwicklung bei Rattenföten und *Hermann* [1956] über das Verhalten der RNS im Laufe der Zahnentwicklung beim Goldhamster veröffentlicht haben.

Als Voraussetzung für die Anwendung der Methylgrün-Pyronin-Färbung zum RNS-Nachweis muß die Herstellung von unentkalkten Schnitten gelten, welche bei harten Objekten erst durch die beschriebene Methylmethacrylat-Einbettung erfüllt wird.

Die Bedeutung der RNS im Zellstoffwechsel ist schon von *Caspersson* [1941] und *Brachet* [1941] erkannt worden und steht seither im Mittelpunkt zahlreicher zytochemischer und elektronenmikroskopischer Untersuchungen. Gerade die neuesten Resultate bestätigen die von diesen Autoren aufgestellten Hypothesen in er-

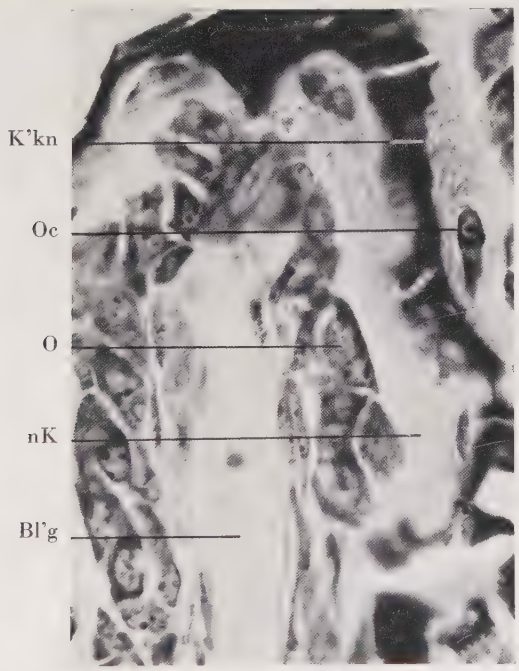


Abb. 14. Längsschnitt durch chondrale Ossifikationszone der Tibia, 1 ½ Wochen alte Maus, Methylgrün-Pyronin-Färbung, 800:1. Das Endothelrohr des Blutgefäßes (Bl'g) trägt einen Mantel aus begleitenden Bindegewebszellen, Prä-Osteoblasten und Osteoblasten (O), wobei die letzteren dem Kalkknorpel (K'kn) bereits neugebildete Knochensubstanz (nK) angelagert und sich vereinzelt zu Osteozyten (Oc) umgeformt haben.

staunlichem Maße. So ist nun die DNS unbestritten der Träger der genetischen Information. Von ihr aus wird der Aufbau von RNS gesteuert, welche als Matrize für die Proteinsynthese dient. Dabei kann die RNS zunächst im Nucleolus, später auch im Zytoplasma nachgewiesen werden. Ihre an sich unspezifische, von der Länge der Polypeptidketten abhängige Affinität zu basischen Farbstoffen – zum Beispiel zum Pyronin – ergibt in Kombination mit der von *Brachet* vorgeschlagenen Ribonuklease-Behandlung einen wertvollen Hinweis auf die Verteilung im Zytoplasma. Das elektronenmikroskopische Bild hat entscheidend zur Klärung der Frage beigetragen, an welche Plasmafraktionen diese Farbreaktion gebunden ist. Es handelt sich um die als Ribosomen bezeichneten Partikel (früher Mikrosomen oder Paladesche Granula genannt), die in enger Beziehung zum endoplasmatischen Retikulum stehen. Auch das von *Garnier* [1899] erstmals in Drüsenzellen beschriebene Ergastoplasma konnte auf diese ultramikroskopischen Strukturen zurückgeführt werden. (Für weitere theoretische und technische Einzelheiten verweisen wir auf das von *Graumann und Neumann* herausgegebene Handbuch der Histochemie, Band 3: Nucleoproteide, 1959.)

Eine starke Pyroninaffinität findet sich vor allem in rasch wachsenden, besonders aber in sekretorisch aktiven Zellen. Dies hängt zusammen mit einer lebhaften Proteinsynthese – im Falle der Stützgewebe mit der Produktion von Kollagen. Sie ist bei gewöhnlichen Fibroblasten und Fibrozyten weniger ausgeprägt als innerhalb von Ligamenten und bei den spezialisierten Sehnenzellen, die zudem noch durch ihre gedrängte räumliche Anordnung die mikroskopische Beobachtung erleichtern. Ebenso werden die Osteoblasten durch ihre Basophilie und den fast epithelialen Verband gekennzeichnet. Die dabei im Zytoplasma von Osteoblasten, Sehnenzellen und – weniger deutlich – Chondroblasten sichtbar werdende Aufhellungszone erweist sich in Vergleichsfärbungen nach Aoyama (*Pritchard*) zum größten Teil als identisch mit dem Golgi-Apparat. Auch diese Zellorganelle ist auf Grund elektronenmikroskopischer Darstellungen klar definiert; sie wird mit Sekretionsvorgängen in Zusammenhang gebracht. Elektronenoptisch lassen sich außer Vakuolen allerdings keine besonderen Strukturen nachweisen, so daß *Knese und Knoop* [1958] lediglich von sogenannten iuxtanukleären Vakuolen sprechen.

Unter den andern bei der Stützgewebsdifferenzierung auftretenden chemischen Verbindungen haben wir vor allem noch die Mucopolysaccharide in Betracht gezogen. Ihre Bewertung drängt

sich geradezu auf, verursachen sie doch im Methylgrün-Pyronin-gefärbten Präparat eine ausgesprochene, durch Ribonuklease unbeeinflußbare Metachromasie der Knorpelgrundsubstanz. Nach den Angaben von *Lison* [1953] ist unbestritten, daß in erster Linie die sauren Mucopolysaccharide eine besonders schöne metachromatische Reaktion ergeben und unter diesen hauptsächlich diejenigen, welche einen oder mehrere Schwefelsäure-Ester besitzen, wie das für die in der Knorpelgrundsubstanz zu 20%–30% enthaltene Chondroitinschwefelsäure zutrifft (*Jorpes und Yamashina* [1956]). Diese Metachromasie stellt für die Beurteilung regenerativ entstandener Stützgewebe eine außerordentliche Hilfe dar, verrät doch gerade der bei In-vitro-Versuchen und in der pathologischen Histologie oft gebrauchte Ausdruck «Chondro-Osteoid» die Unsicherheit, welche bei der Einordnung solcher Gewebe herrscht.

Die Metachromasie deutet dagegen nicht auf Mucopolysaccharide in der Knorpelzelle selbst hin, denn durch Ribonuklease lassen sich diese vollständig entfärben. Hochmolekulare Stoffe dieser Klasse sind also im Zytoplasma nicht vorhanden, jedoch können durch die PAS-Reaktion (siehe S. 179) Mucopolysaccharide von geringerer Molekulargröße nachgewiesen werden. Diese beginnen sich in den Chondroblasten als leuchtend purpurviolette Tröpfchen abzuzeichnen, deren Anzahl in den Chondrozyten ständig zunimmt; schließlich sind die Zellen im Säulenknorpel der chondralen Ossifikationszone ganz von konfluierenden Granula beladen, womit intrazellulär das Maximum der Farbreaktion erreicht ist. Die Knorpelgrundsubstanz wird nie derart stark PAS-positiv.

Mit den geschilderten histochemischen Methoden und Ergebnissen dürfte das Studium der Binde- und Stützgewebsdifferenzierung im Rahmen experimenteller Arbeiten eine beträchtliche Vertiefung erfahren. Daneben ergibt die Anwendung der Methylmethacrylat-Einbettung überzeugend klare Bilder von fötalen und postnatalen Ossifikationsvorgängen, da die Schrumpfungs-Artefakte wegfallen und die feingeweblichen Zusammenhänge gewahrt bleiben.

Damit rückt die Rolle der Blutgefäße erneut ins Zentrum des Verknöcherungsgeschehens. Schon 1937 hat *Krompecher* mit seiner Konzeption der primär angiogenen Ossifikation auf deren Bedeutung hingewiesen, ohne allerdings über die rein mechanische Betrachtungsweise hinauszugehen. Wir glauben, die enge Koppelung der intensiv stoffwechselaktiven Osteoblasten an die Gefäße sei bedingt durch ihren erhöhten Bedarf an Sauerstoff, Mineral- und Nährstoffen.

Es zeigt sich, daß alle in die Verknöcherungszone eintretenden Kapillaren einen pflastersteinartigen Belag von Osteoblasten tragen.

Daß der Gefäß-Apparat auch bei der periostalen Ossifikation einen ausschlaggebenden Einfluß hat, wird in Lehrbuchdarstellungen oft verkannt. Die Rekonstruktionen der Diaphysen menschlicher Föten von *Pinard* offenbaren den erstaunlichen Reichtum dieser Knochenabschnitte an Blutgefäßen. Unsere nach dem beschriebenen Verfahren gewonnenen Schnitte belegen eindrücklich die Auskleidung dieses Kanalsystems durch Osteoblasten und beweisen den von diesen Flächen aus geleisteten Beitrag an die Knochenproduktion. Die Funktion des intermediären Stützgewebes, sei es nun ein Knorpel- oder Fasergerüst, scheint deshalb hauptsächlich in der Abschirmung der zarten, gegen mechanische Kräfte empfindlichen Gefäß-Schlingen zu bestehen (*Schenk und Willenegger* [1961]), deren Osteoblastenhülle dann den Knochen aufbaut.

Zusammenfassung

Da der Ribonukleinsäure-Nachweis nur an unentkalkten Knochenschnitten möglich ist, sind die Untersuchungen über die Differenzierung von Stütz- und Bindegeweben an in Methylmethacrylat eingebetteten Präparaten vorgenommen worden. Dieses Einbettungsverfahren gestattet die Anfertigung von Dünnschnitten (3–5μ), die sich durch ihre außerordentlich geringe Schrumpfung als vorteilhaft für die Beurteilung zytologischer Einzelheiten und feingeweblicher Zusammenhänge erweisen. Der Verzicht auf die Entkalkung verbessert die Aussichten für histochemische Farbreaktionen, von denen in der vorliegenden Arbeit die Methylgrün-Pyronin-Färbung und die PAS-Reaktion eingehend geprüft worden sind.

RNS läßt sich dabei hauptsächlich im Zytoplasma und in den Nucleoli stoffwechselaktiver Zellen, DNS hingegen nur im Kern färberisch darstellen. Während der Zelldifferenzierung steigt allgemein die RNS-Konzentration; sie fällt jedoch in den Ruhe- und Reifestadien wieder ab. Mit der Vermehrung an RNS geht eine gesteigerte Grundsubstanzbildung einher. Quantitative Veränderungen der DNS können mit den angewandten Methoden nicht sicher beurteilt werden.

Die Osteoblasten, die immer enge Beziehungen zu den Blutgefäßen aufweisen, stechen durch ihren besonders hohen RNS-Gehalt hervor. Auch reife, dem Knochen anliegende Osteoblasten besitzen noch die Fähigkeit, sich mitotisch zu teilen.

Die Metachromasie bei der Methylgrün-Pyronin-Färbung und die positive PAS-Reaktion geben während der Chondrogenese einen Hinweis auf die Anreicherung von sauren Mucopolysacchariden, welche für die Grundsubstanzbildung von Bedeutung sind.

Es wird gezeigt, daß bei jeder Art von Ossifikationsgeschehen das Eintreten von mit Osteoblasten umhüllten Gefäß-Schlingen in die Verknöcherungszonen im Vordergrund steht.

Summary

Since the test for ribonucleic acid can be carried out only on bone sections that have not been decalcified, the studies on the differentiation of supporting and connective tissue were carried out on preparations bedded in Methyl-methacrylate. The bedding procedure permits the preparation of thin sections (3–5 μ) which because of their extraordinarily little shrinkage have been found to be advantageous for the evaluation of cytological details and the finer interrelationships of the tissues. The possibilities for histochemical staining reactions are improved by not decalcifying the bone. In this study, the Methyl green-Pyronin staining and the PAS reaction were especially considered.

RNA may be demonstrated chiefly in the cytoplasma and nucleoli of metabolically active cells, the DNA being chiefly in the nucleus. The concentration of RNA rises gradually during cellular differentiation and drops in the stages of rest and maturity. The increase in RNA occurs with an increase in the basic substance. Changes in the quantity of DNA cannot be accurately judged with these methods.

The osteoblasts, which are always intimately related to the blood vessels, show a particularly high RNA content. The mature osteoblasts lying close to the bone still possess the ability to divide mitotically. The metachromasia during chondrogenesis, which is evident in the Methyl green-Pyronin staining and the positive PAS reaction indicates the increase in mucopolysacharides which are important in the formation of basic substance.

The author shows that in the entire process of ossification the determining factor is the penetration of vascular loops surrounded with osteoblasts into the zone of ossification.

Résumé

Etude de la différentiation des tissus de soutien, plus particulièrement des acides nucléiques, sur des coupes d'os non-décalcifié après enrobage au métacrylate de méthyle. A l'aide de cette méthode on obtient des coupes minces (3–5 μ) dont la rétraction est très minime ce qui permet une étude cytologique dans des conditions particulièrement favorables. En évitant la décalcification on augmente les chances de réussite si l'on a en vue des études histochimiques. Dans ces recherches, la coloration au vert de méthyle-pyronine et la réaction PAS ont été plus spécialement considérées.

L'acide ribonucléique (RNS) se trouve surtout dans le cytoplasme et dans les nucléoles de cellules dont le métabolisme est actif; l'acide désoxyribonucléique (DNS) est localisé dans le noyau seulement. Au cours de la différentiation cellulaire la concentration en RNS augmente, elle diminue au cours de la maturation des cellules et au repos. L'augmentation en RNS s'accompagne d'une formation plus considérable de substance fondamentale. La méthode utilisée ne permet pas d'apprécier des modifications quantitatives de DNS.

Les ostéoblastes se reconnaissent grâce à leur teneur particulièrement élevée en RNS; ils présentent des relations nettes avec les vaisseaux sanguins. Les ostéoblastes mûrs, situés en bordure des lamelles osseuses, sont encore capables de se diviser par mitose.

Une coloration métachromatique par le vert de méthyle-pyronine ainsi qu'une réaction PAS positive indiquent, au cours de la chondrogénèse, une accumulation de mucopolysaccharides acides.

L'auteur montre que dans tout phénomène d'ossification le facteur déterminant est l'irruption d'anses vasculaires, entourées d'ostéoblastes, dans les zones d'ossification.

LITERATUR

Birge, E.A. and Imhoff, C.E.: Versenate as a Decalcifying Agent for Bone. Amer. J. clin. Path. *22:* 192–193 (1952).

Bloom, W. and Bloom, M.A.: Calcification of developing bones in embryonic and newborn rats. Anat. Rec. *78:* 497–514 (1940).

Boedtker, H. and Doty, P.: On the nature of structural element of collagen. J. amer. chem. Soc. *77:* 248–249 (1955).

Boellaard, J. W. und v. Hirsch, Th.: Die Herstellung histologischer Schnitte von nicht entkalkten Knochen mittels Einbettung in Methacrylsäure-Ester. Mikroskopie *13:* 386–391 (1959).

Brachet, J.: Ribonukleinsäure und Proteinsynthese; in: Handbuch der Histochemie, Vol. 3, p. 1–33 (Fischer, Jena 1959).

Danis, A.: Etude de l'ossification dans les greffes de moelle osseuse. Acta chir. belg. *56:* Suppl. 3: 1–120 (1957).

Debrunner, H.U.: Zytologische Untersuchungen an den Keimblättern des Hühnchens mit dem Phasenkontrastmikroskop. Vjschr. naturforsch. Ges. Zürich *96:* 23–42 (1951).

Frost, H.M.: Staining of fresh undecalcified thin bone sections. Stain Technol. *34:* 3 (1959).

Gomori, G.: Microscopic Histochemistry (The Univ. of Chicago Press 1952).

Hermann, R.: Das Verhalten der Nukleinsäuren im Laufe der Zahnentwicklung beim Goldhamster. Z. Zellforsch. *45:* 176–194 (1956).

Jorpes, E. und Yamashina, J.: Die Mucopolysaccharide und Glucoproteide des menschlichen Bindegewebes; in: Chemie und Stoffwechsel von Binde- und Knochengewebe: 25–53 (Springer, Berlin 1956).

Kelly, J.W.: The metachromatic reaction; in: *Heilbrunn-Weber*sProtoplasmologia, Handbuch der Protoplasmaforschung, vol. II/D2: 3–98 (Springer, Wien 1956).

Knese, K.H.: Die periostale Osteogenese und Bildung der Knochenstruktur bis zum Säuglingsalter. Z. Zellforsch. *44:* 585–643 (1956). – Die diaphysäre chondrale Osteogenese bis zur Geburt. Z. Zellforsch. *47:* 80–113 (1957). – Elektronenoptische Untersuchungen über die periostale Osteogenese. Z. Zellforsch. *48:* 455–478 (1958).

Krompecher, St.: Die primär angiogene Knochenbildung. Magyar orvosi Arch. *35:* 418–425 (1934). – Die Knochenbildung (Fischer, Jena 1937). – Fonction et forme. Nouveaux points de vue et résultats dans l'adaptation fonctionnelle, régénération et néo-différenciation des tissus. VI. Congr. Féderatif Internat. d'Anatomie, p. 122 (Paris 1955). – Die quantitative Adaptation der Gewebe. Z. mikr.-anat. Forsch. *64:* 59 (1958). – Die Beeinflußbarkeit der Gewebsdifferenzierung der granulierenden Knochenoberflächen insbesondere die der Callusbildung. Arch. clin. Chir. *281:* 472–512 (1956).

Lipp, W.: Neuuntersuchungen des Knochengewebes. Acta anat. *20:* 162–200 (1954).

Lison, L.: Histochimie et Cytochimie; 2. Aufl. (Gauthier-Villars, Paris 1953).

McLean, F. C. and Bloom, W.: Calcification in normal growing bone. Anat. Rec. *78:* 333–352 (1940).

McLean, F. C. and Urist, M.: Bone (Gauthier-Villars, Paris 1955).

Mikrotom-Nachrichten: Heft 4, April 1960: Über Einbettung harter Objekte.

Pauwels, F.: Eine neue Theorie über den Einfluß mechanischer Reize auf die Differenzierung der Stützgewebe. Z. Anat. EntwGesch. *121:* 478–515 (1960).

Pinard, A.: Structure et vaisseaux de la diaphyse des os longs chez le foetus humain. Acta anat. *15:* 180–215 (1952).

Ponlot, R.: Le radiocalcium dans l'étude des os (Masson, Paris 1960).

Pritchard, J. J.: A cytological and histochemical study of bone and cartilage formation in the rat. J. Anat., Lond. *86:* 259–277 (1952).

Rickenbacher, J.: Die Nukleinsäuren in der Augenentwicklung bei Amphibien und beim Hühnchen. Roux' Arch. EntwMech. *145:* 387–402 (1952).

Rubin, P. S. and Howard, J. E.: Histochemical studies on the role of acid mucopolysaccharides in calcifiability and calcification. Trans. Macy Found., Sek. Conf. on Metabolic Interrelations, p. 155–166 (New York (1950).

Ruppricht, W.: Knochenzellen und Fortsätze der Odontoblasten. Verh. d. Anat. Ges. Amsterdam: 239–243 (1930).

Schenk, R. und Willenegger, H.: Zur Biomechanik der Frakturheilung. Vortrag, gehalten am 2. Kurs der Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen (Davos 1961).

Streeter, G. L.: Developmental horizons in human embryos. A review of the histogenesis of cartilage and bone. Contrib. Embryol. Carneg. Inst. *33:* 149–168 (1949).

Wassermann, F.: Über die strukturellen Grundlagen der Chemie und des Stoffwechsels der Stützsubstanzen; in: Chemie und Stoffwechsel von Binde- und Knochengewebe: 1–24 (Springer, Berlin 1956).

Eingegangen 17. April 1962

Adresse des Autors: K. Hell, Anatomisches Institut der Universität, Pestalozzistraße 20, *Basel* (Schweiz)